

A03



*Vai al contenuto multimediale*

Antonio Sacco  
Daniela Sacco

## **Lezioni IRMS**

Analisi isotopiche attraverso metodi spettroscopici  
per la caratterizzazione di matrici agroalimentari





Aracne editrice

[www.aracneeditrice.it](http://www.aracneeditrice.it)  
[info@aracneeditrice.it](mailto:info@aracneeditrice.it)

Copyright © MMXIX  
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

[www.gioacchinoonoratieditore.it](http://www.gioacchinoonoratieditore.it)  
[info@gioacchinoonoratieditore.it](mailto:info@gioacchinoonoratieditore.it)

via Vittorio Veneto, 20  
00020 Canterano (RM)  
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-2012-5

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,  
di riproduzione e di adattamento anche parziale,  
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie  
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: gennaio 2019

*A mio padre Antonio,  
scomparso prima  
di vedere pubblicato  
il suo ultimo lavoro.*



# Indice

- 9 *Introduzione*
- 11 *Capitolo I*  
*Frazionamento isotopico*
- 13 *Capitolo II*  
*Interazione pianta–ambiente*
- 17 *Capitolo III*  
*Confronto tra piante C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>*
- 19 *Capitolo IV*  
*Unità di misura*
- 21 *Capitolo V*  
*Frazionamento isotopico e applicazioni*
- 23 *Capitolo VI*  
*Scale per definire il contenuto isotopico*
- 27 *Capitolo VII*  
*Strumentazione*
- 33 *Capitolo VIII*  
*Contenuto di <sup>18</sup>O nell'acqua*
- 37 *Capitolo IX*  
*Rapporti D/H attraverso NMR*
- 43 *Capitolo X*  
*Confronti tra NMR e IRMS*

8     Indice

45    Capitolo XI  
      *Applicazioni agro-alimentari*

51    Capitolo XII  
      *Succhi di frutta*

53    *Conclusioni*

## Introduzione

Isotopo (iso+topos) = stesso posto. Isotopo (“isos” stesso, “topos” posto) elementi che occupano la stessa posizione nella tavola periodica (Fig. 1): hanno stesso numero atomico  $Z$  (stesso numero di elettroni e uguali proprietà chimiche), ma diverso numero di massa  $A$  (stesso numero di protoni ma differente numero di neutroni).

### Esempio

$H_2$   $^{16}O$ , a pressione atmosferica, bolle a  $100^\circ C$ , mentre la  $D_2$   $^{16}O$  bolle a  $101,42^\circ C$  e l' $H_2$   $^{18}O$  a  $100,14^\circ C$ .

Anche la reattività molecolare è funzione della sostituzione isotopica. Ad esempio nel caso dei legami C–H e C–D, essendo più stabile il legame con l'isotopo più pesante, le molecole che portano l'isotopo più leggero sono più reattive: effetto isotopico. Quest'ultimo può portare ad un frazionamento isotopico.

1 H																	2 He	
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn	
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt										
			58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
			90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

Figura 1. Tavola periodica degli elementi.



## Frazionamento isotopico

La variazione naturale di abbondanza isotopica nelle molecole è conseguenza delle diverse proprietà chimico-fisiche degli isotopi di uno stesso elemento.

Fenomeni responsabili d'importanti frazionamenti isotopici in natura (Fig. 1.1):

- a) le transizioni di fase;
- b) la velocità di reazione (sia per reazioni chimiche che enzimatiche).

Lo scambio isotopico riguardante una transizione di fase, ad esempio il passaggio dalla fase liquida a quella vapore, può portare ad un consistente frazionamento isotopico.

Gli oceani, che costituiscono il più grande deposito d'acqua naturale, sono caratterizzati da un notevole scambio tra fase liquida e fase vapore (che va a formare le nuvole).

A seguito di questo fenomeno l'acqua degli oceani risulta molto più ricca di  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$  rispetto all'acqua piovana.

Nel fenomeno delle precipitazioni c'è frazionamento isotopico perché le molecole d'acqua che contengono gli isotopi più pesanti tendono a precipitare più velocemente.

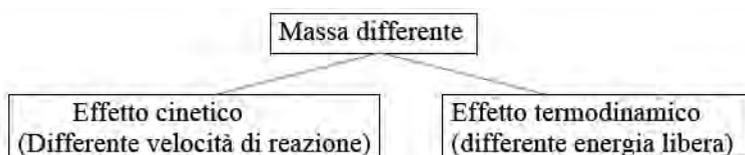


Figura 1.1. Effetti associati alla differente massa.

Quindi man mano che le precipitazioni si spostano dalle coste verso l'interno si osserva una diminuzione del contenuto in isotopi pesanti nell'acqua di precipitazione.

## Interazione pianta–ambiente

Per le piante l'acqua è la fonte primaria di idrogeno e la fonte principale di ossigeno per la biosintesi delle varie molecole organiche (Fig. 2.1).

L'acqua viene assimilata dalle piante attraverso le radici e scambiata con l'esterno tramite la respirazione. Alla respirazione delle piante, che avviene a livello fogliare attraverso gli stomi, è collegato un equilibrio tra fase liquida (l'acqua della pianta) e fase vapore (l'acqua che evapora dalla pianta) che produce un frazionamento isotopico<sup>1</sup>.

La Fig. 2.2 mostra i fattori che influenzano i rapporti isotopici dei prodotti animali.

### *Esempio*

Disidratando un succo di frutta e ricostituendolo con acqua di rubinetto si ottiene un succo di composizione chimica molto simile a quello di partenza ma con una composizione isotopica in  $^2H$  e  $^{18}O$  più bassa rispetto al succo originale.

Possiamo distinguere succhi freschi da succhi ricostituiti, poiché i primi avranno un contenuto in isotopi pesanti maggiore.

### **2.1. Fotosintesi**

Nelle piante il processo della fotosintesi è fonte di un fenomeno di frazionamento isotopico molto importante.

1. Alla base del frazionamento isotopico sta il fatto che le molecole d'acqua contenenti l'isotopo più pesante tendono ad evaporare meno velocemente rispetto a quelle contenenti l'isotopo più leggero. Per questo motivo l'acqua contenuta nelle piante (acqua vegetativa) è più ricca in isotopi pesanti rispetto all'acqua del suolo. La diversità di contenuto isotopico è alla base della metodica per la determinazione dell'annacquamento.

La pianta utilizzando  $\text{CO}_2$  atmosferica e  $\text{H}_2\text{O}$  proveniente dal suolo, attraverso il processo della fotosintesi, forma glucosio che è il precursore per la biosintesi di altri metaboliti quali glucidi, lipidi, amminoacidi etc.

Il diverso contenuto in  $^{13}\text{C}$  permette di differenziare tre tipi di piante:

- le piante  $\text{C}_3$  caratterizzate dal ciclo fotosintetico di *Calvin* (Fig. 2.3);
- le piante  $\text{C}_4$  caratterizzate dal ciclo di *Hatch-Slack*;
- le piante CAM che utilizzano entrambi i cicli.

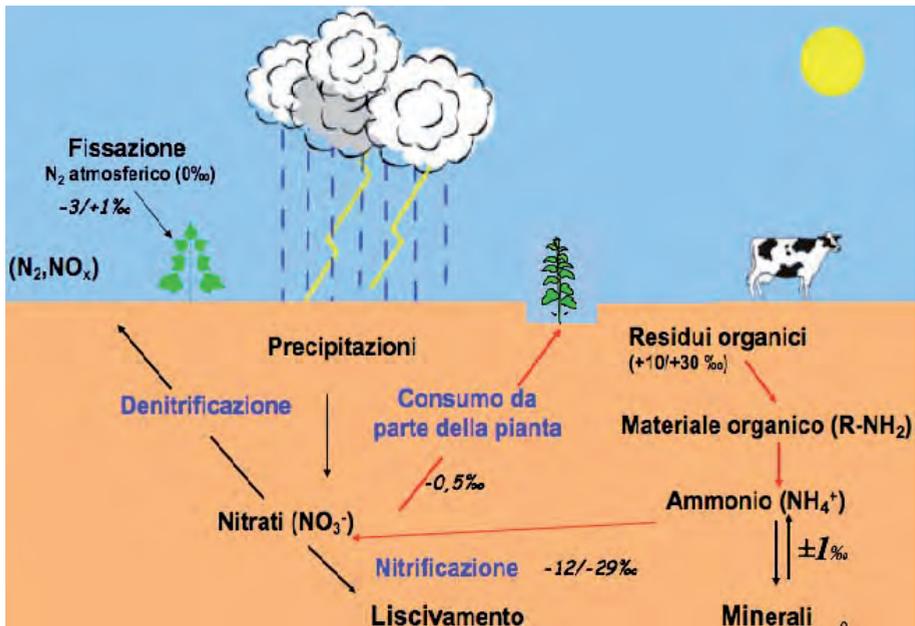


Figura 2.1. Parametri che influenzano il rapporto  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  nei composti vegetali.



Figura 2.2. Parametri che influenzano i rapporti isotopici dei prodotti animali.

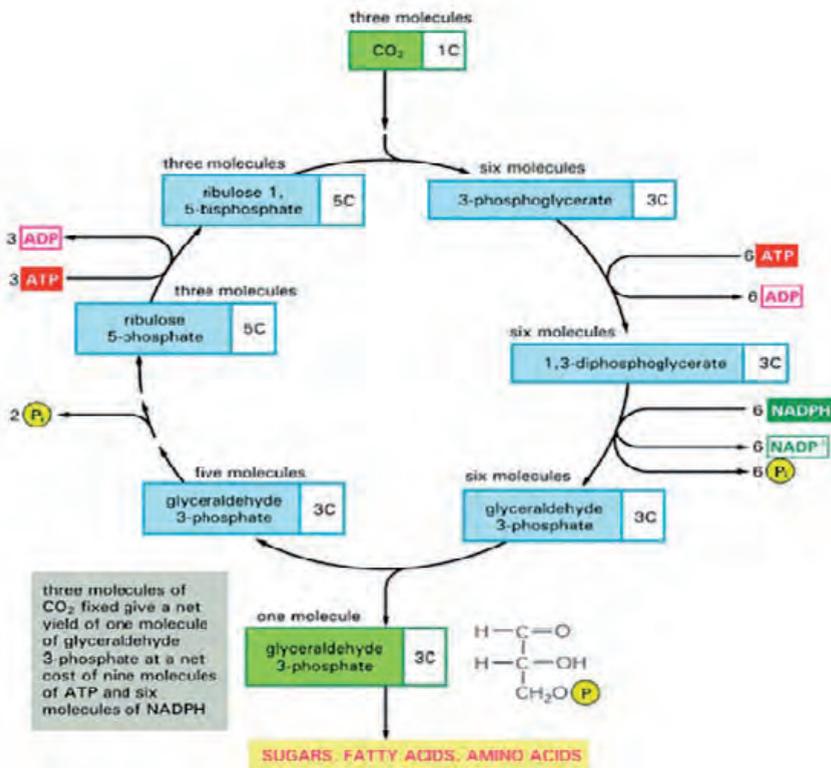


Figura 2.3. Ciclo fotosintetico di Calvin.



## Confronto tra piante $C_3$ e $C_4$

In una pianta  $C_3$ , la  $CO_2$  atmosferica viene adsorbita attraverso gli stomi delle foglie e fissata dall'enzima rubisco (ribuloso bifosfato carbossilasi) dando l'intermedio 3-fosfo-glicerato, molecola a tre atomi di carbonio.

Il ciclo viene appunto chiamato  $C_3$  perché la  $CO_2$  viene fissata nella molecola a tre atomi di carbonio.

All'azione del rubisco è associato un notevole frazionamento isotopico. Infatti, mentre la  $CO_2$  atmosferica ha un valore isotopico, espresso in  $\delta\text{‰}$ , pari a  $-8$ , nelle piante  $C_3$  il valore isotopico è compreso tra  $23/-30$ .

Nel ciclo fotosintetico delle piante  $C_4$ , la  $CO_2$  introdotta viene dapprima disciolta nell'acqua della cellula come carbonato con l'ausilio dell'enzima Anidrasi Carbonica; poi l'intervento di un altro enzima [il PEP (fosfoenolopivurato) Carbossilasi] trasferisce la  $CO_2$  ad un intermedio a quattro atomi di carbonio (ad esempio un ossalacetato). Di seguito la  $CO_2$  viene rilasciata per entrare nel ciclo di Calvin.

Le piante  $C_4$  hanno un contenuto in  $^{13}C$  molto più alto ( $-9/-14$ ) rispetto alle piante  $C_3$  ( $-23/-30$ ) (Fig. 3.1).

Considerando che il valore di circa  $-8$  è tipico della  $CO_2$  atmosferica, il frazionamento isotopico nelle piante  $C_4$  non è molto elevato. Questo significa che l'incorporazione della  $CO_2$ , catalizzato dall'enzima PEP, è molto più efficiente rispetto a quello della rubisco, e quindi il frazionamento isotopico osservato, che è quasi vicino allo zero, è minore rispetto a quello delle piante  $C_3$ .

Questo permette alle piante che utilizzano il ciclo fotosintetico  $C_4$  di resistere a condizioni climatiche più sfavorevoli rispetto alle piante  $C_3$ .

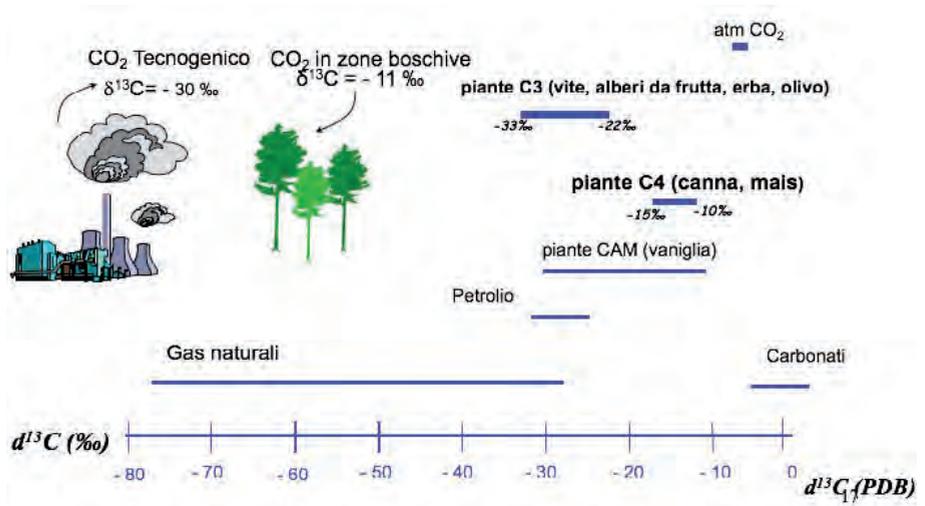


Figura 3.1. Composizione isotopica del carbonio di alcune sostanze naturali.

## Unità di misura

Le abbondanze isotopiche possono essere espresse in varie maniere: come unità assolute, ad esempio come atomo per cento cioè il contenuto isotopico ogni 100 atomi, come rapporto isotopico tra l'isotopo più pesante e quello più leggero, oppure in unità relative, ad esempio attraverso la scala dei  $\delta$ , che si ottiene attraverso la seguente formula Eq. (4.1)

$$\delta\text{‰} = \frac{R_C - R_S}{R_S} * 1000 \quad (4.1)$$

nel caso del rapporto  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Eq. (4.2)

$$\delta^{13}\text{C}\text{‰} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_c - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_s}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_s} * 1000 \quad (4.2)$$

c = campione;

s = standard.

Lo standard internazionale usato per il rapporto isotopico  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  è un carbonato (Pee Dee Belemnite).

Per il  $^2\text{H}$  e per l' $^{18}\text{O}$  lo standard è un'acqua (Standard Mean Ocean Water – SMOW).

Nella scala  $\delta$ , per convenzione, viene assegnato il valore zero allo standard.

Nel caso del  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , essendo il carbonato standard arricchito in  $^{13}\text{C}$  rispetto al materiale organico da analizzare, si otterranno sempre valori negativi di  $\delta$  per le matrici agroalimentari Eq. (4.2).

Più elevato è il valore assoluto di  $\delta$  tanto minore sarà l'arricchimento isotopico del campione analizzato.

In genere, le piante  $\text{C}_4$  hanno valori nella scala dei  $\delta$  tra  $-9$  e  $-14$ , mentre quelle  $\text{C}_3$  valori tra  $-23$  e  $-30$ .

Le piante C<sub>3</sub> hanno meno <sup>13</sup>C rispetto alle piante C<sub>4</sub> e questa differenza, ad esempio, permette di discriminare uno zucchero di canna da uno di barbabietola.

I carbonati sono più ricchi in <sup>13</sup>C rispetto alla CO<sub>2</sub> atmosferica.

I carbonati sono la fonte di carbonio nel ciclo acquatico.

Quindi i prodotti marini si differenziano da quelli di origine terrestre per un contenuto in <sup>13</sup>C tendenzialmente maggiore.

## Frazionamento isotopico e applicazioni

Due stadi di frazionamento isotopico:

- a) a livello del ciclo atmosferico si ha un frazionamento degli isotopi contenuti nell'acqua ( $^{18}\text{O}$  e  $^2\text{H}$ ). Questo frazionamento è dovuto allo scambio di acqua tra gli oceani e le nuvole che con la pioggia forniscono  $\text{H}_2\text{O}$  alle piante. A loro volta le piante tramite le foglie scambiano con l'atmosfera;
- b) a livello del ciclo fotosintetico (del glucosio e derivati).

La Fig. 5.1 riporta, in maniera semplificata, gli scambi pianta/ambiente. In Fig. 5.2, invece, i parametri che influenzano il rapporto D/H nei composti vegetali.

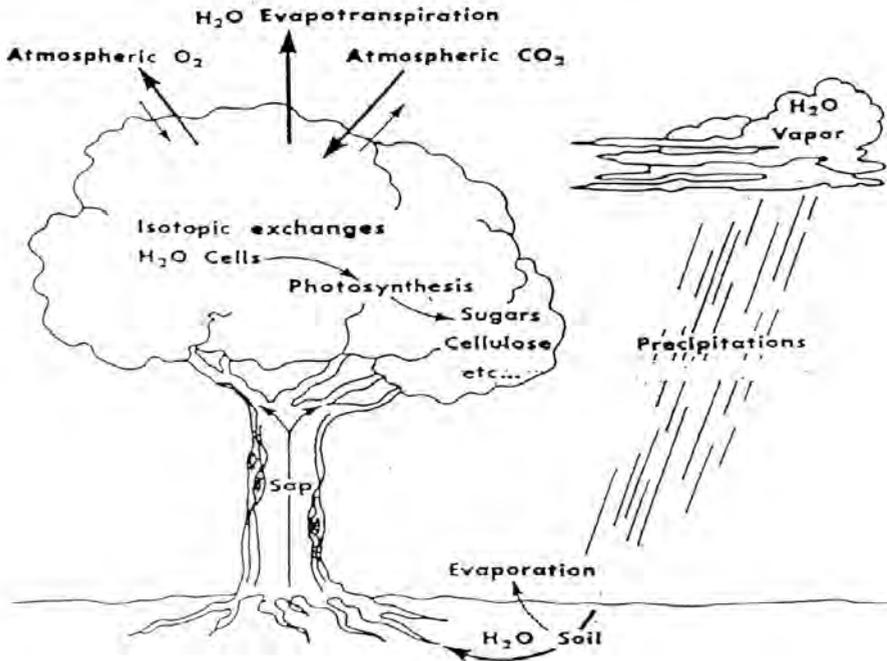


Figura 5.1. Schema scambi pianta-ambiente.

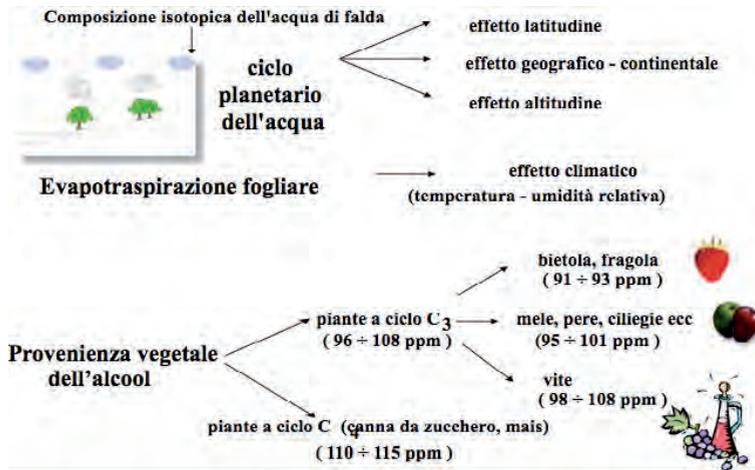


Figura 5.2.

## Scale per definire il contenuto isotopico

- a) Scala relativa dei delta utilizzata per tutte le misure fatte con spettrometri di massa isotopica: è molto utile per esprimere le differenze a livello isotopico naturale;
- b) scala assoluta dei p.p.m: utilizzata quando i dati vengono ottenuti tramite NMR. Ad esempio, se il contenuto di deuterio in un vino è 150 p.p.m. per ogni milione di atomi di H ci sono 150 atomi di D;
- c) scala assoluta atomo%: il  $^{13}\text{C}$  è mediamente l'1,1% rispetto al  $^{12}\text{C}$ : ogni cento atomi di  $^{12}\text{C}$  ci sono 1,1 atomi di  $^{13}\text{C}$ . Questa unità di misura è molto utilizzata quando si effettuano misure in arricchimento isotopico.

Per “isotopi non stabili” intendiamo quelli “radioattivi” che tendono a cambiare la loro concentrazione nel tempo a causa di reazioni chimiche.

A livello di abbondanza isotopica naturale l'isotopo radioattivo più utilizzato è il  $^{14}\text{C}$ . Visto che il  $^{14}\text{C}$  ha un tempo di dimezzamento di 5720 anni (tempo in cui dimezza la sua concentrazione) questo atomo è molto usato per la radiodating.

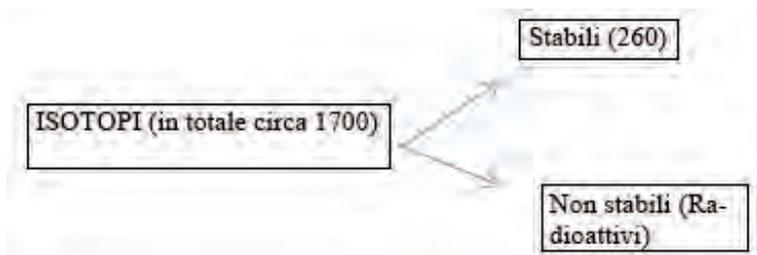


Figura 6.1. Tipologia di isotopi.

### 6.1. $^{14}\text{C}$ per l'attribuzione dell'annata ad un prodotto risalente agli ultimi 50 anni: per esempio un vino

Il valore di  $^{14}\text{C}$ , a livello naturale, prima di questi esperimenti si aggirava intorno a 14 d.p.m./g. (disintegrazioni per minuto per grammo di carbonio).

Successivamente vi è stato un rapido incremento di questo valore che raggiunse il suo massimo intorno agli anni Sessanta (circa 28 d.p.m.).

Da quel periodo in poi si è avuta una diminuzione costante del contenuto di  $^{14}\text{C}$  fino ad arrivare ad un valore molto vicino a quello naturale.

Visto che il decadimento è stato costante e veloce si può utilizzare questo metodo per distinguere diverse annate di produzione di un vino. Il metodo è applicabile per prodotti ottenuti tra il 1960 e il 1990.

### 6.2. Applicazione degli isotopi marcati in campo bio-medico

Tecnica alternativa all'endoscopia capace di determinare la presenza o l'assenza di elico-bacter.

L'*helicobacter* è un batterio che, se presente nello stomaco, può favorire la comparsa dell'ulcera.

Al paziente prima viene misurato il contenuto isotopico ( $^{13}\text{C}$ ) della  $\text{CO}_2$  emessa (livello base); poi gli si somministra una quantità d'urea marcata con  $^{13}\text{C}$ . Si misura quindi l'arricchimento isotopico nella  $\text{CO}_2$ .

Se si osserva un aumento del contenuto in  $^{13}\text{C}$ , ciò è indice della presenza dell'*helicobacter*. Infatti, questo aumento nel contenuto di  $^{13}\text{C}$  è dovuto al fatto che l'urea viene metabolizzata dall'*elico-bacter* come fonte di azoto.

### 6.3. $^{13}\text{C}$ per riconoscere un americano da un italiano misurato sulla $\text{CO}_2$ emessa

L'alimentazione degli americani si basa prevalentemente su carne ottenuta da animali nutriti con piante  $\text{C}_4$ .

La dieta mediterranea si basa molto su frutta e verdura di piante di tipo  $C_3$ .

La  $CO_2$  emessa da un americano è certamente più ricca in  $^{13}C$  di quella di un nostro connazionale.

Se però l'italiano mangiasse per circa due settimane quello che mangia un americano medio (o viceversa) non si potrebbe più fare distinzione tra i due, visto che l'organismo tende ad equilibrarsi isotopicamente con ciò che viene ingerito.



## Strumentazione

### Spettrometro di Massa Isotopica

Lo spettrometro di massa isotopica (Isotope Ratio Mass Spectrometer, IRMS) è strutturato in maniera tale da poter misurare l'abbondanza di un isotopo, in un campione gassoso, rispetto a quella di un gas di riferimento della medesima specie e dal contenuto isotopico noto

#### 7.1. Schema di uno spettrometro IRMS

Una via di introduzione del campione e una del gas di riferimento.

Valvola che permette di mandare selettivamente il gas che deriva dal campione in esame o il gas di riferimento alla sorgente ionica, operante sotto alto vuoto.

Il fascio di ioni così generato viene convogliato sull'analizzatore (costituito da un elettromagnete) dove viene deviato e raccolto in particolari rivelatori a seconda delle masse considerate (Fig. 7.1).

Lo spettrometro di massa isotopica (IRMS): misura di  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

Accoppiamento dell'IRMS con l'analizzatore elementare.

$$\delta\text{‰} = \frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{riferimento}}}{R_{\text{riferimento}}} \cdot 1000$$

{R è il rapporto tra l'isotopo meno abbondante a quello più abbondante}.

L'IRMS viene normalmente accoppiato con un analizzatore elementare in quanto misura solo molecole semplici ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}$ ).

Lo spettrometro di massa isotopica, funziona esclusivamente su campioni di gas elementari (per esempio  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ).

Se il campione da analizzare è un solido o un liquido, esso deve essere convertito in  $CO_2$  per effettuare l'analisi del  $^{13}C$ .

Se il campione è azotato, occorre convertirlo in  $N_2$  per misurare il rapporto isotopico dell'azoto.

Con lo spettrometro di massa isotopica si misurano i rapporti isotopici, quindi viene determinata con precisione l'intensità dei fasci ionici relativi alle masse delle specie molecolari che portano i vari isotopi.

## 7.2. Descrizione

Come sorgente di ioni si usa essenzialmente la ionizzazione per bombardamento elettronico.

Il filamento ha un potenziale di 70–80 eV e gli elettroni da esso emessi collidono con le particelle di gas.

In seguito a tale bombardamento si generano ioni positivi che vengono spinti verso l'analizzatore da un piatto repulsore carico positivamente.

Il fascio di ioni generato viene focalizzato tramite lenti focalizzanti e diventa più stretto.

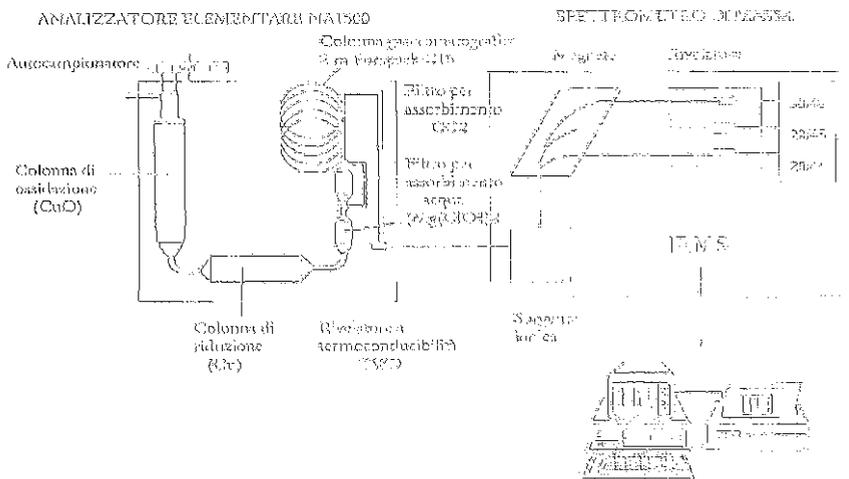


Figura 7.1. Schema Spettrometro IRMS.

Nella sorgente avviene la ionizzazione del campione.

Un repeller respinge gli ioni e fornisce loro l'energia cinetica per raggiungere l'analizzatore.

Quest'ultimo è un settore magnetico ove i fasci sono deviati in funzione del loro rapporto  $M/e$ .

La misura del rapporto isotopico dipende dal numero di ioni che collidono all'interno dei collettori che sono delle gabbie di Faraday.

Gli ioni collidendo provocano una corrente elettrica la cui intensità viene misurata.

### *Esempio*

Determinare il rapporto isotopico  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .

La misura si effettua su  $\text{N}_2$  in fase gassosa; si prendono in considerazione le specie isotopiche  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}_2$ . Si sceglie il corretto voltaggio di accelerazione e l'intensità del campo magnetico in modo che lo ione  $^{14}\text{N}_2^+$  di  $M/e = 28$  e lo ione  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^+$  di  $M/e = 29$  vengano focalizzati sui corrispondenti rivelatori.

Lo ione di  $M/e = 28$  segue il cammino  $M_1$  e costituisce il fascio ionico più intenso in quanto, essendo formato dall'isotopo più leggero, è quello che presenta la maggiore abbondanza isotopica. Lo ione di  $M/e = 29$ , con l'isotopo più pesante, segue un cammino  $M_2$  e costituisce il fascio ionico minore (Fig. 7.2).

## 7.3. Preparazione del campione

Se si vuole determinare il contenuto isotopico di una matrice allo stato liquido o solido, è necessario che essa venga convertita in gas. Per evitare la possibilità di avere frazionamento isotopico, le procedure di preparazione ed i passaggi chimici devono essere del tutto quantitativi. Non tutte le preparazioni che si adottano sono quantitative ma possono essere ugualmente utilizzate purché si conosca il fattore di frazionamento isotopico intervenuto.

I sistemi di preparazione dei campioni da analizzare possono essere offline oppure online. Il sistema offline consiste nel preparare il campione con un sistema non interfacciato direttamente allo spettrometro di massa. I sistemi online sono direttamente interfacciati allo spettro-

metro di massa e in questo caso le misure vengono effettuate molto più velocemente.

#### 7.4. Interfacciamento dello Spettrometro di Massa Isotopica con un Analizzatore Elementare per la combustione totale del campione

Il campione viene introdotto nel primo forno, chiamato forno di ossidazione, riempito con catalizzatori del tipo  $Cr_2O_3$  e  $Co_3O_4$ , che si trova a temperatura di  $1100^\circ C$ . Vi è un flusso di elio come carrier. Quando si introduce il campione in tale forno, automaticamente è introdotta anche una piccola quantità di ossigeno, ottenendo una "flash combustion". Si raggiunge istantaneamente una temperatura intorno a  $1800^\circ C$  e si ottiene una completa ossidazione del campione. Dopo tale combustione, si ottiene una miscela di gas formata da  $CO_2$ ,  $N_2$  e una serie di ossidi di azoto ( $N_xO_y$ ) e  $H_2O$ .

Se interessa fare misure di  $^{13}C$ , i gas sono convogliati all'analizzatore.

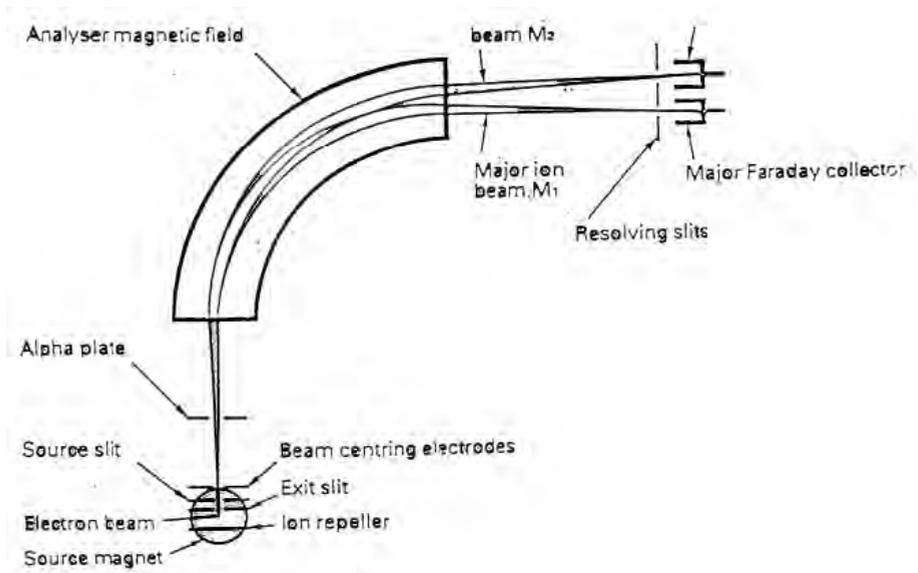


Figura 7.2.

Se, invece, siamo interessati alla separazione degli isotopi dobbiamo convertire gli ossidi di azoto.

I gas passano attraverso un secondo forno, chiamato forno di riduzione, che si trova a temperatura di  $650^{\circ}\text{C}$  e riempito con rame. Qui avviene l'ossidazione del rame e la riduzione degli ossidi di azoto in  $\text{N}_2$ . Nel caso l'acqua non sia un composto di interesse vi è una trappola di  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  (anidrone) che trattiene l'acqua. I due gas ( $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$ ) coeluenti vengono quindi separati tramite una colonna cromatografica.

### **7.5. CO ottenuta per Pirolisi per misurare il rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ nelle matrici solide**

Non è possibile utilizzare una combustione normale, in quanto il tenore isotopico dell'ossigeno utilizzato per l'ossidazione andrebbe a sovrapporsi a quello del campione sottoposto ad analisi. Si opera pertanto una pirolisi che ad alta temperatura (circa  $1200\text{--}1400^{\circ}\text{C}$ ) e in presenza di catalizzatori di ossidazione, degrada il campione in assenza di  $\text{O}_2$ , trasformandolo in  $\text{CO}$ .



## Contenuto di $^{18}\text{O}$ nell'acqua

Per determinare l'eventuale annacquamento di un prodotto. Il contenuto di  $^{18}\text{O}$  nell'acqua vegetativa è maggiore rispetto a quello dell'acqua di sorgente.

### *Esempio*

Un succo deriva direttamente dalla spremitura del frutto oppure da un processo di disidratazione e successiva aggiunta di acqua?

Bisogna determinare il rapporto isotopico  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  dell'acqua contenuta nel campione da analizzare. Si dissolve una piccola quantità di  $\text{CO}_2$  in un grande eccesso di acqua di sorgente, di cui si vuol determinare il contenuto isotopico, ad una temperatura controllata e costante. Quando la  $\text{CO}_2$  si scioglie in acqua, si instaura un equilibrio tra  $\text{CO}_2$  ed  $\text{H}_2\text{CO}_3$  con uno scambio tra gli atomi di ossigeno dell'acqua e della  $\text{CO}_2$ . Operando in largo eccesso di acqua, essa impone il suo contenuto isotopico. Il contenuto di  $^{18}\text{O}$  viene quindi determinato sulla  $\text{CO}_2$  dopo equilibrizzazione.

Per la  $\text{CO}_2$  si hanno 12 possibilità di combinazione di tali isotopi tra loro, ottenendo le seguenti distribuzioni statistiche delle specie isotopiche:

$$\begin{array}{ll}
 {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} = 98.426 \% & \rightarrow \text{M} = 44 \\
 {}^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} = 1.095 \% & \\
 {}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} = 0.079 \% & \\
 {}^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} = 0.395 \% & \rightarrow \text{M} = 45 \quad \text{totale} = 1.174 \% \\
 {}^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} = 9 * 10^{-4} \% & 
 \end{array}$$

**Tabella 8.1.** Rapporti isotopici normalmente indagati negli alimenti  $D/H$ ,  $^{13}C/^{12}C$ ,  $^{15}N/^{14}N$ ,  $^{18}O/^{16}O$ ,  $^{34}S/^{32}S$ .

Elemento	Isotopo stabile	Abbondanza naturale % media	Standard di riferimento internazionale
Idrogeno	$^1H$	99.985	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)
	$^2H$	0.015	
Carbonio	$^{12}C$	98.892	V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) Carbonato di calcio fossile
	$^{13}C$	1.108	
Azoto	$^{14}N$	99.6337	AIR (Azoto dell'aria)
	$^{15}N$	0.3663	
Ossigeno	$^{16}O$	99.7587	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)
	$^{17}O$	0.0375	
	$^{18}O$	0.2039	

$$^{12}C^{17}O^{17}O = 1.6 * 10^{-5} \%$$

$$^{13}C^{18}O^{16}O = 4.4 * 10^{-3} \% \quad \rightarrow \quad M = 46 \quad \text{totale} = 0.396 \%$$

$$^{12}C^{18}O^{17}O = 1.6 * 10^{-5} \%$$

$$^{13}C^{17}O^{17}O = 1.8 * 10^{-7} \%$$

$$^{12}C^{18}O^{18}O = 4 * 10^{-4} \% \quad \rightarrow \quad M = 47 \quad \text{totale} = 4.56 * 10^{-3} \%$$

$$^{13}C^{18}O^{17}O = 1.8 * 10^{-6} \% \quad \rightarrow \quad M = 48 \quad \text{totale} = 4 * 10^{-4} \%$$

$$^{13}C^{18}O^{18}O = 44 * 10^{-6} \% \quad \rightarrow \quad M = 49 \quad \text{totale} = 44 * 10^{-6} \%$$

Ognuna di queste specie ha una sua importanza in relazione all'abbondanza isotopica naturale degli isotopi in essa contenuti.

Le masse 47, 48 e 49 rappresentano circa lo 0.005 % del totale. Tali masse non contribuiscono significativamente al contenuto isotopico.

Le masse 44, 45 e 46 sono quelle più rappresentative.

### Esempio

La massa 49,  $^{13}C^{18}O^{18}O$ , la probabilità di avere una molecola di  $CO_2$  con tali isotopi è molto bassa ( $4.4 * 10^{-6} \%$ ).

Quando si è interessati al rapporto isotopico  $^{13}C/^{12}C$ , per il  $^{12}C$  si deve prendere in esame la  $M = 44$ , per il  $^{13}C$  la  $M = 45$ .

Anche un'altra specie ha  $M = 45$ , ovvero la  $^{12}C^{17}O^{16}O$ , specie poco abbondante ma non trascurabile.

Il fascio ionico di  $M = 45$  deve essere corretto per il contributo dato dalla specie  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ . Questo viene fatto misurando l'intensità del fascio ionico di  $M = 46$ , cioè della specie  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ , considerando le abbondanze relative di  $^{18}\text{O}$  e  $^{17}\text{O}$  e il fatto che esiste una correlazione tra esse: tale correzione viene chiamata "Craig correction".

La scala dei delta, espressa secondo l'Eq. (4.2), può essere scritta anche nel seguente modo:

$$\delta\text{‰} = (R_C - R_S)/R_S * 10^3 = (R_C/R_S - 1) * 10^3$$

Lo standard internazionale per il carbonio è la PDB, Pee Dee Belemnite, di cui è noto il valore  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.12372$ , al quale convenzionalmente si attribuisce il valore  $\delta \equiv 0$ .

Noto un valore di  $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ , è possibile calcolare il valore  $R_C$ .

$$\delta^{13}\text{C}\text{‰} = -10 = (R_C/1.12372 - 1) * 10^3$$

$$R_C = 1.11246$$

$$\Delta(R_C - R_S) = 0.01124$$

per calcolare il valore di  $\delta$  del campione rispetto allo standard internazionale, nel caso venga utilizzato uno standard secondario, si usa la seguente formula:

$$\delta_{c-r} = \delta_{c-s} + \delta_{s-r} + \delta_{c-s} * \delta_{c-r} * 10^{-3}$$

c = campione standard;

r = standard di riferimento internazionale;

S = standard secondario.



## Rapporti D/H attraverso NMR

La risonanza magnetica nucleare (NMR) permette di ottenere informazioni sulla misura del rapporto isotopico sito-specifico di una determinata molecola.

Lo spettro che si ottiene analizzando un campione con questa tecnica è funzione della sua struttura molecolare.

Il Deuterio si trova in natura in quantità molto limitata e non è distribuito uniformemente sull'intero globo terrestre.

### *Esempio*

allorquando l'acqua evapora, una maggior quantità di HDO rimane nella fase liquida rispetto alla più volatile  $H_2O$ . L'acqua che evapora (vapor d'acqua), arricchita in  $H_2O$ , dai climi più caldi vicino all'equatore raggiunge le regioni più fredde e condensa di nuovo a liquido. Il risultato che ne deriva è una bassa concentrazione di HDO nelle regioni polari rispetto alla concentrazione riscontrata nelle regioni prossime all'equatore. Infatti il contenuto di deuterio nell'acqua è circa 90 ppm al Polo Sud e 160 ppm all'equatore.

L'abbondanza del deuterio nei composti organici si misura attraverso spettroscopia di massa.

### *Limite*

Metodo che determina il contenuto totale del deuterio nel composto, ma non rivela la distribuzione del deuterio nell'ambito del composto.

La conoscenza della distribuzione del deuterio in una molecola può essere usata come discriminante nell'analisi di numerosi composti naturali e può, quindi, rivelare l'origine geografica e/o biologica dei campioni analizzati.

La distribuzione del deuterio in una molecola di zucchero varia in funzione dello specifico percorso fotosintetico utilizzato nella sua sintesi, dal contenuto in HDO nell'acqua consumata dalla pianta e dalle condizioni ambientali dell'habitat della pianta.

Infatti, le piante in cui lo zucchero viene sintetizzato attraverso il ciclo  $C_4$  di Hatch–Slack distribuiscono il deuterio diversamente dalle piante che utilizzano il ciclo  $C_3$  di Calvin.

### 9.1. Misura di D/H: Risonanza Magnetica Nucleare del D (SNIF $^2H$ -NMR)

- a)  $I = 1 \rightarrow$  nucleo con distribuzione non simmetrica  $\rightarrow$  breve  $T_1$  e  $T_2$ . Bassa sensibilità (D poco abbondante e  $\gamma \ll$ );
- b) FT con impulso a  $90^\circ$ ;
- c) solo molecole semplici (alcol, glicerina, acido acetico);
- d) grandi quantità di campione (per alcool: 3 g);
- e) sistema di lock, di solito alla frequenza del fluoro, per evitare drift del campo magnetico;
- f) disaccoppiamento del protone;
- g)  $S/N > 150$  (ca. 200 scansioni per spettro);
- h) 8 spettri per un tempo totale di ca. 4 ore;
- i) processore di dati spettrali dedicato.

#### *Esempio*

Lo spettro NMR del deuterio dell'etanolo è costituito da tre picchi (Fig. 9.1):

- a) metilico ( $CH_2DCH_2OH$ ) (I);
- b) metilenico ( $CH_3CHDOH$ ) (II);
- c) idrossilico ( $HOD - CH_3CH_2OD$ ) (III).

Misura di D/H: Risonanza Magnetica Nucleare del D (SNIF  $^2H$ -NMR). Spettrometro a 9.4T (400 MHz) (Bruker, Karlsruhe, Germania) dotato di campionatore automatico e corredato di sonda specifica per l'osservazione del "deuterio" (61.4 MHz per  $B_0 = 9.4T$ ), avente un

canale di disaccoppiamento del protone e un canale di stabilizzazione del campo magnetico (lock) alla frequenza del fluoro.

$$\begin{aligned} (D/H)_I &\rightarrow CH_2DCH_2OH \\ (D/H)_{II} &\rightarrow CH_3CHDOH \\ R &= 2(D/H)_{II}/(D/H)_I \end{aligned}$$

Con lo SNIF-NMR si determina l'abbondanza naturale del deuterio e della sua distribuzione nella molecola di etanolo.

Lo SNIF-NMR è stato applicato a diversi composti naturali ed è diventato un metodo classico di analisi nell'industria agro-alimentare.

Questa tecnica viene usata per identificare contraffazioni, eventuali diluizioni e adulterazioni come ad esempio l'aggiunta di zucchero esogeno prima della fermentazione per aumentare il grado alcolico del vino.

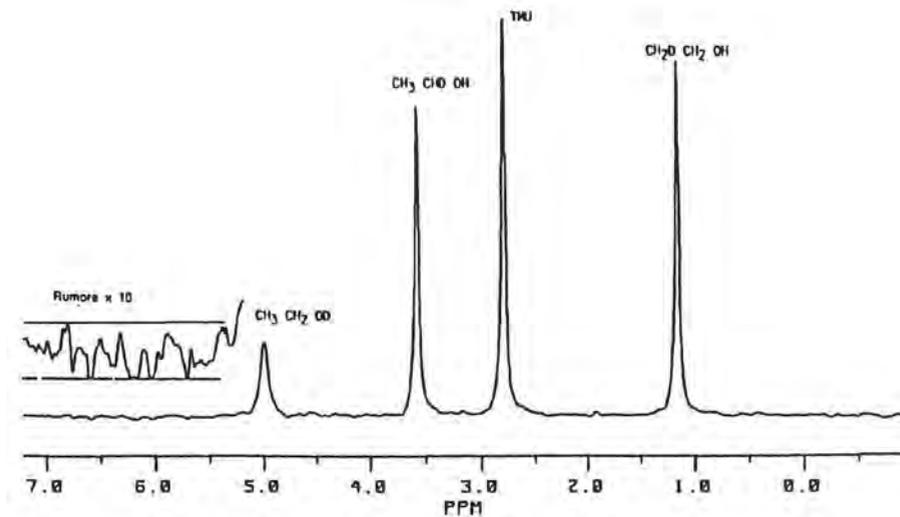


Figura 9.1. Spettro NMR del deuterio dell'etanolo.

## 9.2. Come si effettua l'esperimento SNIF–NMR

I sei campioni scelti per questo esperimento hanno tutti un relativamente elevato grado alcolico: etanolo sintetico (Aaper alcool, 100%), rum (Bacardi, 76%), tequila (Cuevo Especial, 40%), cognac (Remy Martin, 40%), brandy (Apple Jack, 50%) e vodka (Luksusowa, 40%). L'etanolo sintetico è stato preparato direttamente attraverso idratazione catalica dell'etilene, il rum dalla fermentazione della canna da zucchero, la tequila proveniva dalla agave plant, il cognac dall'uva, il brandy dalle mele e la vodka dalle patate.

### *Discussione*

$$R = 3(II)/(I)$$

R = descrive la distribuzione relativa di deuterio nel frammento etilico della molecola;

(I) e (II) = rappresentano le altezze dei picchi per i corrispondenti segnali del deuterio metilici (I) e metilenici (II) rispetto all'altezza dello standard interno.

Se non avvenisse nessun frazionamento isotopico e quindi il deuterio fosse distribuito statisticamente, il rapporto del deuterio al sito (I) rispetto a quello del sito (II) dovrebbe essere 3:2 e, di conseguenza, il valore di R dovrebbe essere di 2.0.

Valori più elevati di 2 indicano un arricchimento del deuterio sul sito metilenico (II) rispetto al sito metilico (I).

Il valore di R varia in conseguenza al processo fermentativo e allo zucchero usato.

L'acqua presente durante la fermentazione ha un significativo effetto sul contenuto di deuterio del sito metilenico, mentre lo zucchero determina la concentrazione isotopica del sito metilico.

Il valore di R da solo è adeguato a discernere alcune, ma non tutte, provenienze dello zucchero:

$$C = (I) + (II)/(s)k$$

C = la concentrazione relativa di deuterio, (usata per ottenere informazioni aggiuntive sui campioni);

(I) e (II) = rappresentano le altezze dei picchi per i corrispondenti segnali del deuterio metilici (I) e metilenici (II) rispetto all'altezza dello standard interno;

s = l'altezza del picco dello standard esterno;

k = fattore di correzione (per tenere conto del fatto che non tutti i campioni hanno eguali concentrazioni di etanolo).

- a) Un campione di etanolo puro dovrebbe avere un fattore di correzione 1.0; un campione al 40% di etanolo dovrebbe avere un coefficiente di 0.40. (Regolamenti governativi richiedono che il grado alcolico dichiarato nell'etichetta deve essere accurato entro l'1%);
- b) campioni di etanolo provenienti dalla stessa origine (p.e. canna da zucchero in una stessa località) dovrebbero avere valori comparabili di R e C;
- c) etanolo derivante da differenti origini (p.e. canna da zucchero o patata) o da differenti località (p.e. Germania e Italia o Francia) dovrebbero avere valori di R e C che possono essere facilmente distinguibili l'uno dall'altro (Fig. 9.2).

Dopo avere ottenuto gli spettri, le altezze dei picchi dei siti metilico e metilenico vengono determinati in funzione di quella dello standard. Assegnando all'altezza del picco dello standard un valore pari a 1.00, i valori dei parametri C saranno compresi tra 1.00 e 1.50. Esperimenti ripetuti sullo stesso campione forniscono un cluster di data points nel diagramma in cui su un asse viene riportato il rapporto sito-specifico relativo del deuterio, R, e sull'altro la concentrazione di deuterio relativa allo standard, C (Fig. 9.2).

[I dati ottenuti sono troppo scatterati per distinguere tra zuccheri provenienti da differenti origini geografiche]. Tuttavia, anche se alcuni data points individuali per differenti campioni si sovrappongono (p.e. i valori del cognac ottenuto da uve e quelli del brandy ottenuti da mele), i valori medi sono perfettamente distinguibili.

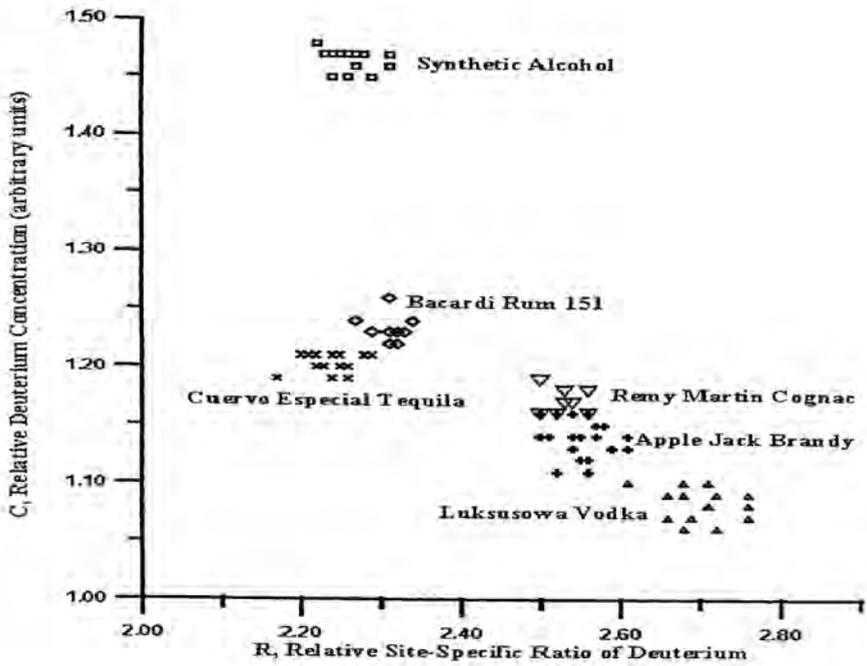


Figura 9.2. Applicazione dello SNIF-NMR.

## Confronti tra NMR e IRMS

- a)* La tecnica NMR risulta non distruttiva (il campione si può recuperare dopo la misura);
- b)* è sito-specifica (si ottengono informazioni sul contenuto isotopico di differenti posizioni nella molecola in esame);
- c)* non richiede una preparazione complessa del campione;
- d)* la tecnica IRMS è più sensibile (richiede quantità di campione estremamente più basse);
- e)* il costo è decisamente minore;
- f)* permette una caratterizzazione multi-isotopica del composto analizzato.



## Applicazioni agro–alimentari

- a) La determinazione dell'origine botanica dello zucchero è uno degli utilizzi pratici dell'analisi NMR;
- b) l'alcool dei vini e dei distillati è originato dalla fermentazione degli zuccheri;
- c) le piante appartengono alle classi  $C_3$ ,  $C_4$  e CAM, che sono contraddistinte da differenti contenuti isotopici (in particolare  $^{13}C$ ). Le piante  $C_4$  risultano più arricchite nell'isotopo più pesante rispetto a quelle  $C_3$ , quindi lo zucchero prodotto da piante  $C_4$  sarà anch'esso arricchito dell'isotopo più pesante rispetto a quello prodotto da piante  $C_3$ . Di conseguenza l'etanolo prodotto da fermentazione dello zucchero avrà un diverso arricchimento isotopico a seconda della diversa origine botanica (Fig. 11.1).

Per poter analizzare un alcool quantitativamente allo SNIF–NMR è necessario che la percentuale di etanolo sia al 90%. Questo comporta per i vini, che hanno comunemente una percentuale in etanolo compresa tra 10 al 15% (chiamato grado alcolico), la necessità di distillare il campione in esame al fine di ottenere alcool ad alta gradazione.

Questa operazione potrebbe comportare un certo frazionamento isotopico una distillazione quantitativa.

Sono stati sviluppati degli studi che hanno confermato una relazione tra il contenuto isotopico dello zucchero di partenza e l'alcool prodotto dalla fermentazione dello stesso.

Nel caso dell'etanolo il rapporto D/H del gruppo metilico è correlato con l'origine botanica dello zucchero, mentre il rapporto D/H del gruppo metilenico è correlato al rapporto D/H del mezzo di fermentazione.

## 11.1. Vini

*Determinazione dell'aggiunta fraudolenta di zucchero ai vini per aumentarne il grado alcolico*

In Italia è consentito lo zuccheraggio dei vini, ma a condizione che lo zucchero sia di uva e per un aumento di grado alcolico non superiore ai 2 gradi alcolici.

Lo zucchero d'uva è più costoso rispetto, ad esempio, allo zucchero di barbabietola.

La barbabietola da zucchero è una pianta  $C_3$  come la vite, quindi andando ad analizzare il  $^{13}C$  non noterei alcuna differenza tra i due tipi di zuccheri.

Basandoci invece sul rapporto isotopico D/H è possibile risalire facilmente a questo tipo di frode (vedi tabella).

Se un vino naturale presenta un certo valore isotopico D/H, l'aggiunta di zucchero di barbabietola provocherà un abbassamento del

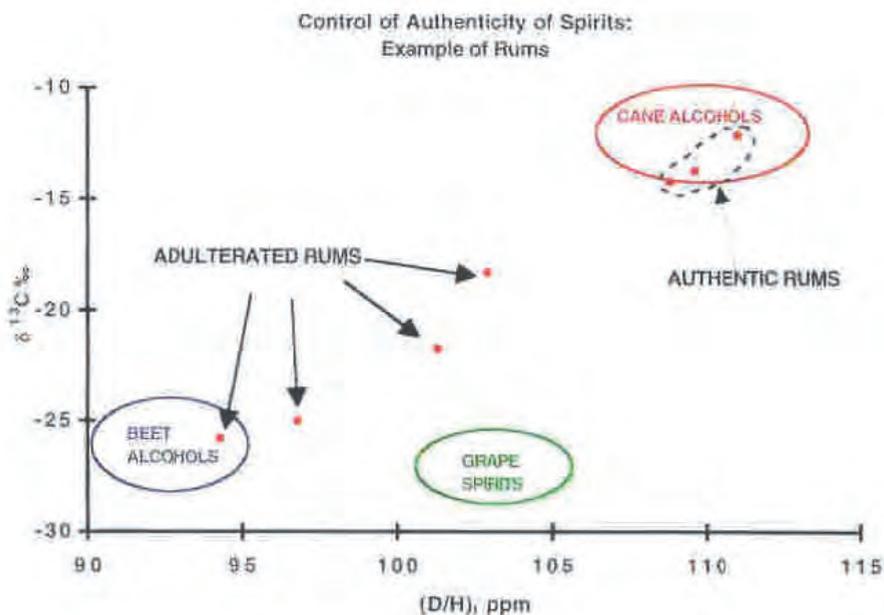


Figura 11.1. Controllo di autenticità di un rum.

segnale al sito metilico, perché, anche se la barbabietola è una pianta  $C_3$  come la vite, essa presenta un contenuto isotopico in deuterio più basso, mentre il contenuto in  $^{13}C$  è simile.

Se durante le fermentazione aggiungo zucchero di canna ( $C_4$ ) il valore di  $^{13}C$  dell'alcool finale sarà maggiore rispetto a quello dell'alcool naturale.

È noto però che ci sono molti fattori che influenzano questo valore isotopico per cui se un vino presenta valore isotopico medio pari a 100 ppm sarà possibile trovare vini che vengono dal Nord o Sud Italia con valori differenti per le diverse condizioni climatiche.

## 11.2. Ricerca di vini adulterati

Sono necessari dei valori di riferimento, non solo per distinguere lo zucchero di uva da quello di barbabietola ma anche per capire se in una miscela vi è una certa percentuale di zucchero di barbabietola il che è notevolmente più difficile. Per poter applicare lo SNIF NMR all'analisi dello zuccheraggio in Europa si sta creando una banca dati di vini di origine nota, provenienti dalle varie zone vitivinicole.

Questo metodo di analisi è ufficiale per tutta la Comunità europea e può essere utilizzato per la certificazione di qualità di un vino.

## 11.3. Aromi

Le tecniche isotopiche vengono applicate soprattutto per distinguere aromi di origine naturale, ottenuti per estrazione da piante o per biogenerazione da precursori naturali, dagli aromi ottenuti per sintesi chimica o da precursori non naturali.

## 11.4. Vanillina

Una frode possibile è l'utilizzo di vanillina di sintesi al posto di quella più costosa di origine naturale ottenuta per estrazione.

La vanillina prodotta a partire da composti petrolchimici è povera di  $^{13}C$  (con valori generalmente inferiori a  $-26\text{‰}$ ) rispetto a quella na-

turale, che derivando da una pianta a ciclo fotosintetico CAM, mostra valori tra  $-17$  e  $-21\%$ .

La misura del contenuto di  $^{13}\text{C}$  è stata quindi utilizzata a tale scopo, finché non sono apparse sul mercato vanilline arricchite artificialmente in  $^{13}\text{C}$  al sito metilico o carbossilico, per riprodurre il valore globale di  $^{13}\text{C}$  della vanillina naturale.

Per scoprire tale sofisticazione è necessario degradare la vanillina nelle posizioni arricchite prima di determinarne il contenuto isotopico.

### 11.5. Essenza di lampone

A tutela del consumatore si sta cercando di caratterizzare la natura di questi aromi, cioè se sono di origine sintetica o naturale.

La determinazione del contenuto sito specifico di deuterio dell'anello aromatico tramite  $^2\text{H}$ -NMR si è dimostrata diagnostica per il riconoscimento dell'origine naturale o sintetica dei precursori: in particolare il contenuto del deuterio in orto e in meta rispetto all'ossidrile è differente a seconda che il precursore sia naturale o sintetico (Fig. 11.2).

### 11.6. Aceto

L'acido acetico, che deriva dall'ossidazione del metanolo, è contenuta nell'aceto.

Il contenuto isotopico dell'alcool da vino è confrontabile con quello dell'aceto da vino.

Una possibile frode consiste nell'utilizzare acido acetico di origine industriale al posto di quello derivante da vino o da frutta, decisamente più costoso.

Per smascherare la frode si può analizzare il contenuto di  $^{14}\text{C}$ . In alternativa, per i composti di origine petrolchimica, si osservano contenuti isotopici differenti dai composti di origine naturale.

Ad esempio, il contenuto in  $^{13}\text{C}$  dei composti non naturali è più basso, mentre il contenuto in deuterio è più alto, rispetto a quelli naturali.

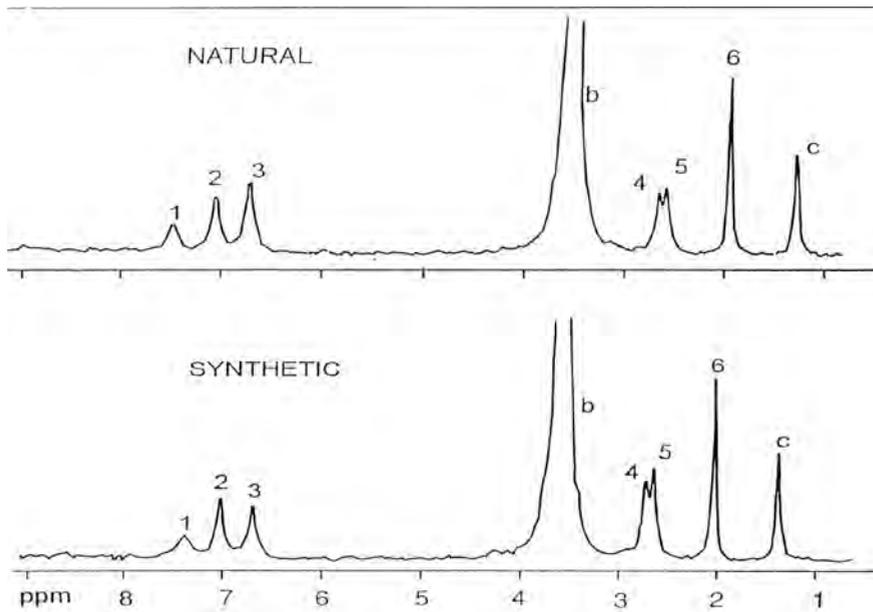
## 11.7. Miele

*Adulterazione del miele con sciroppi zuccherini, specialmente derivanti da piante  $C_4$*

Le piante da fiore da cui le api succhiano il nettare per poi produrre il miele appartengono al gruppo delle piante  $C_3$ , il miele presenta un contenuto in  $^{13}C$  tipico di queste ultime. È possibile evidenziare l'aggiunta di questi sciroppi zuccherini al miele.

*Limite*

La grande variabilità del contenuto di  $^{13}C$  nei mieli a causa delle diverse origini botaniche e geografiche delle piante utilizzate dalle api.



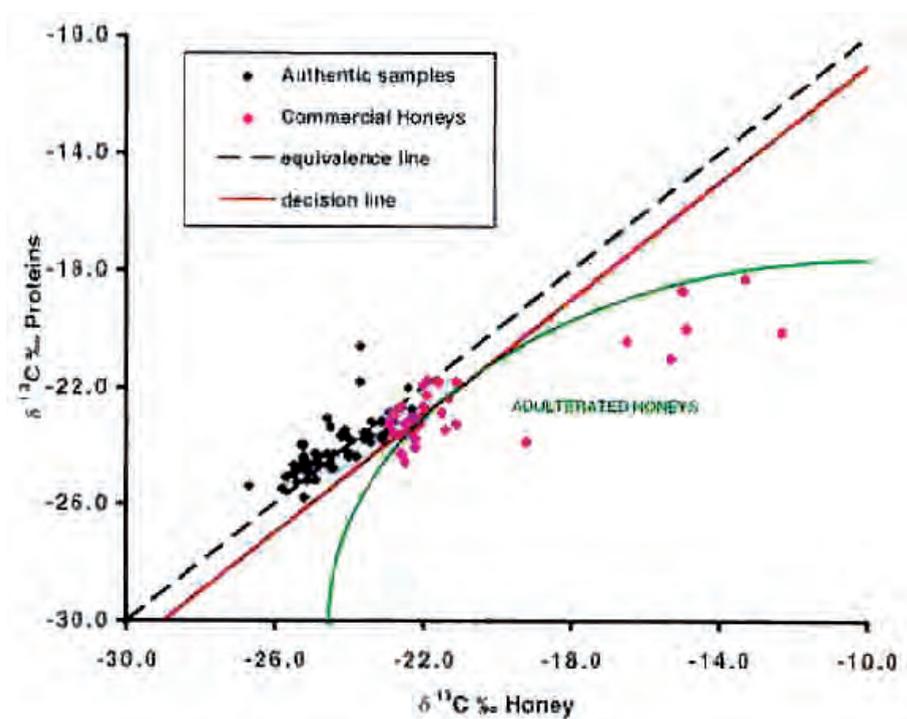
**Figura 11.2.** Confronto tra spettri  $^2H$  – NMR (deuterio in orto e in meta rispetto all'OH).

### Rimedio

Si è studiata la correlazione di valore di  $^{13}\text{C}$  tra il miele e la frazione proteica precipitata dal miele stesso.

Infatti esiste una correlazione lineare tra il contenuto isotopico del miele e la frazione proteica, e la differenza di valore non è superiore ad una unità di delta.

Quindi, se si analizza un campione di miele e si vede che tra il suo contenuto in  $^{13}\text{C}$  e quello della frazione proteica sussiste una differenza superiore ad un delta, allora il miele è da considerare sospetto (Fig. II.3).



**Figura II.3.** Correlazione tra  $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$  bulk e  $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$  della frazione proteica del miele per individuare eventuali adulterazioni.

## Succhi di frutta

- a) Zuccheraggio;
- b) annacquamento;
- c) riconoscimento di succhi da spremitura da succhi ottenuti da reidratazioni di succhi concentrati;
- d) origine (geografica e botanica).

L'annacquamento può essere indagato con l'analisi del rapporto isotopico del  $^{18}\text{O}$ . Per un succo di frutta genuino, oppure ottenuto per spremitura diretta del frutto, i valori di  $^{18}\text{O}$  sono positivi (caratteristici di acqua vegetativa), mentre nei campioni diluiti il contenuto di  $^{18}\text{O}$  diminuisce sino a valori negativi (questo è dovuto all'aggiunta d'acqua di falda).

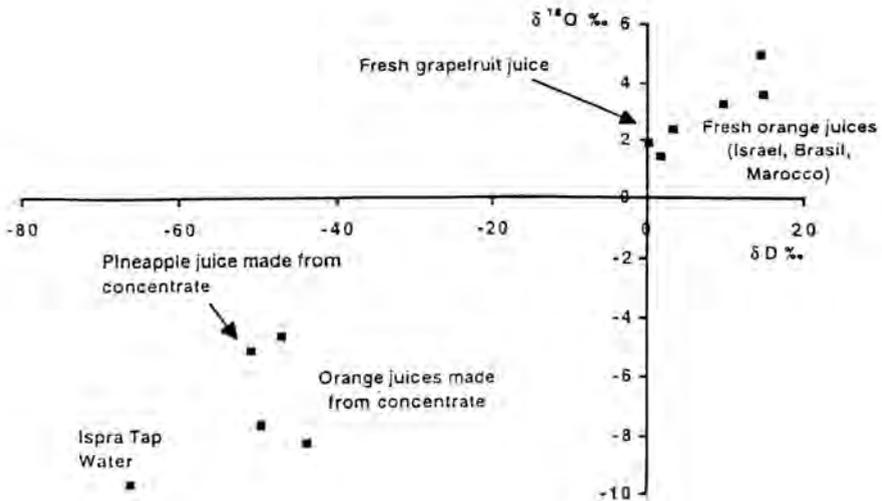
Oltre al valore di  $^{18}\text{O}$  può essere determinato anche il valore di  $^2\text{H}$ .

I succhi di frutta provenienti da processi di prima spremitura avranno valori sia di  $^{18}\text{O}$  sia di  $^2\text{H}$  positivi. Invece, succhi di frutta che provengono da concentrati o da prodotti disidratati e congelati i valori di  $^{18}\text{O}$  e  $^2\text{H}$  sono negativi (Fig. 12.1).

- a) Nei succhi di frutta può essere usata la metodica SNIF-NMR per la determinazione dello zuccheraggio, dopo aver trasformato lo zucchero del succo in etanolo tramite fermentazione;
- b) per i succhi di frutta, come per il vino, c'è il problema dell'origine geografica. In base all'origine geografica si avranno valori isotopici diversi, correlati con la climatologia del luogo di provenienza del frutto;
- c) per i succhi di frutta si sono messi a punto dei metodi preparativi per la separazione di alcuni costituenti (vedi l'esempio del miele). La separazione più semplice è quella della polpa tramite una semplice centrifugazione, nella quale viene determinato il

contenuto di  $^{13}\text{C}$  che è messo poi in relazione con quello degli zuccheri;

- d) in questo caso i valori di  $^{13}\text{C}$ , tra gli zuccheri e la polpa, saranno simili poiché quest'ultima è formata in gran parte da cellulosa. Altre frazioni che vengono isolate sono gli zuccheri, gli acidi, gli amminoacidi. Grazie alle tecniche cromatografiche possono venire isolati anche singoli costituenti di queste frazioni (ad esempio si possono isolare dalla frazione zuccherina singolarmente il glucosio, il fruttosio e il saccarosio).



**Figura 12.1.** Correlazione tra  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$  per verificare la genuinità di un succo di frutta.

## Conclusioni

Lo scopo è di investigare l'esistenza di correlazioni tra i valori isotopici delle varie frazioni o singoli costituenti, per aumentare l'efficacia dell'analisi isotopica contro le frodi. Questi metodi d'investigazione isotopica basati sull'analisi di più costituenti di un alimento hanno lo scopo di rendere più difficile la frode, in quanto il frodatore deve cercare di calibrare in modo preciso l'aggiunta di vari composti di conosciuto valore isotopico.



AREE SCIENTIFICO–DISCIPLINARI

AREA 01 – Scienze matematiche e informatiche

AREA 02 – Scienze fisiche

AREA 03 – **Scienze chimiche**

AREA 04 – Scienze della terra

AREA 05 – Scienze biologiche

AREA 06 – Scienze mediche

AREA 07 – Scienze agrarie e veterinarie

AREA 08 – Ingegneria civile e architettura

AREA 09 – Ingegneria industriale e dell’informazione

AREA 10 – Scienze dell’antichità, filologico–letterarie e storico–artistiche

AREA 11 – Scienze storiche, filosofiche, pedagogiche e psicologiche

AREA 12 – Scienze giuridiche

AREA 13 – Scienze economiche e statistiche

AREA 14 – Scienze politiche e sociali

AREA 15 – Scienze teologico–religiose

*Il catalogo delle pubblicazioni di Aracne editrice è su*

[www.aracneeditrice.it](http://www.aracneeditrice.it)

Finito di stampare nel mese di gennaio del 2019  
dalla tipografia «System Graphic S.r.l.»  
00134 Roma – via di Torre Sant’Anastasia, 61  
per conto della «Giacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale» di Canterano (RM)